

新規生物活性類縁体の創製を目指した放線菌代謝産物の生合成研究

富山大学和漢医薬学総合研究所 資源開発部門 天然化学分野

伊藤 卓也

1. はじめに

これまでに放線菌やカビなどの微生物からは、多種多様な生物活性物質が見出されてきた。その中には、感染症やガンなどの治療薬として使用され、多くの人命を救ってきているものも少なくない。^{1,2)} 近年、免疫抑制剤であるシクロスポリン、³⁾ FK506⁴⁾や糖尿病治療薬であるアカルボース⁵⁾のように、抗菌活性や抗ガン活性以外の生物活性を示す代謝産物も微生物から単離されている。このように医薬品や医薬リード化合物の探索において、微生物由来の二次代謝産物はさらに重要な探索源になると考えられる。しかしながら、毒性が強い、あるいは、体内で分解されやすいなどの理由により、医薬品としては利用できない生物活性二次代謝産物も多い。このことから、毒性の軽減および薬効の向上、薬物動態の改善を目的として、有機合成的に代謝産物の一部を修飾・変換して医薬品開発することが多く、高脂血症薬プラバスタチン⁶⁾や糖尿病薬ボグリボース⁷⁾なども微生物代謝物を化学変換して開発された。

近年、化学的手法だけでなく、遺伝子工学的および分子生物学的手法を用いて活性物質生産菌を改変し新たな新規類縁体を産生させる技術も確立されようとしている。このようなことから、著者らは、抗真菌物質 antimycin および抗細菌物質 asukamycin に着目し、新規類縁体の創製を目指したこれら化合物の生合成研究について概説する。

2. Aminohydroxybenzoic acid (AHBA) の生合成

放線菌は、菌糸や孢子を形成するため形態的に真核生物であるカビとよく間違えられるが、分類学的にはグラム陽性細菌に属する分化の進んだ細菌である。また、放線菌の特徴として、多様性に富んだ二次代謝産物が生産されることが知られており、マクロライド系抗生物質のエリスロマイシン、および抗結核作用を示すアミノグリコシド系抗生物質ストレプトマイシン、抗 MRSA 作用を示すペプチド抗生物質バンコマイシン、テトラサイクリン系抗生物質など化学構造だけでなく生物活性にも興味深い代謝物が見出されている。^{1,2)} 近年、これら化合物群の生合成研究も進んでおり、生合成経路の解明および新たな類縁体創製にも成功している。著者らも C7N unit を含む validamycin^{8,9)}や acarbose,¹⁰⁾ pactamycin¹¹⁾などの放線菌が産生するアミノサイクリトールの生合成研究を行っている。C7N unit は、2-*epi*-5-*epi*-valiolone および 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (3,5-AHBA)を最小単位として、^{12,13)} アミドグリコシド系やアンサマクロライド系抗生物質の重要な生合成中間体である。その生合成経路は、シキミ酸経路と類似していることが知られており、2-*epi*-5-*epi*-valiolone は、シキミ酸合成の初期の酵素 3-dehydroquinic acid synthase (DHQs)と非常に相同性の高い 2-*epi*-5-*epi*-valiolone synthase により、sedoheptulose 7-phosphate から生合成される。また、3,5-AHBA も同様に、DHQ 合成酵素と相同性の高い amino DHQs により amino 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate (DAHP)から amino DHQ が生成され、数工程を経て生合成される。(Fig. 1)

一方、antimycin および asukamycin には、それぞれ *N*-formamidesalicylic acid (FSA)および 3-amino 4-

hydroxybenzoic acid (3,4-AHBA) を生合成中間体とする C7N unit が含まれる．しかしながら，一般的な C7N unit とは異なった経路により生成されることが予想され，これら化合物の生合成に興味を持たれる．

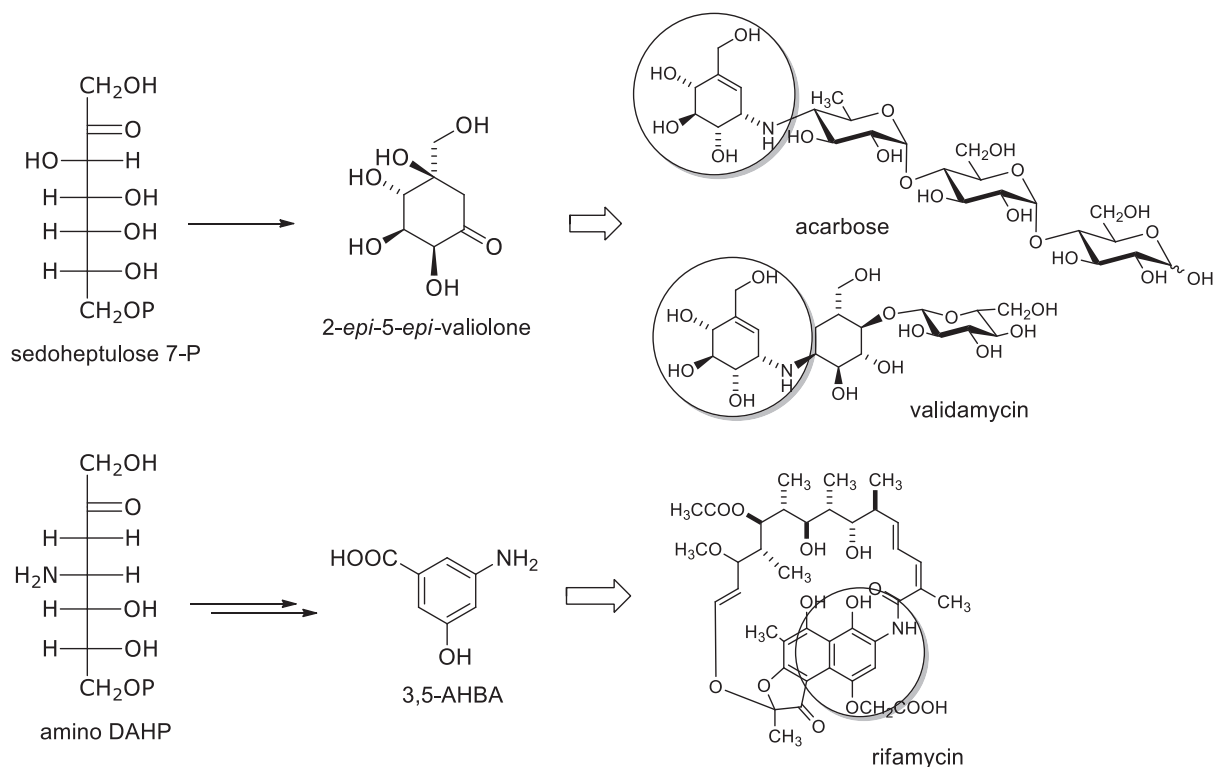


Fig. 1. C7N containing compounds from microorganisms, and biosynthesis of 2-*epi*-5-*epi*-valiolone and amino DAHP.

3. Antimycin の生合成研究

3-1 Antimycin 生合成遺伝子群のクローニング

数種の放線菌が産生する antimycin は，スレオニンおよび *N*-formamidesalicylic acid (FSA)，低級脂肪酸からなるジラクトンで，非常に強い細胞毒性及び抗真菌活性を示す．¹⁴⁾ その作用機序は電子伝達系の呼吸阻害ということが知られており，このため，生化学試薬として頻用されている．¹⁵⁾ しかしながら，毒性が高いために臨床試験を断念した経緯があり，新たな類縁体の創製が切望されている．最近，角田らは，antimycin の全合成を達成し，さらには側鎖部分の異なる類縁体を数多く合成している．¹⁶⁾ 著者らは，これら類縁体について真菌 *Candida albicans* に対する抗菌活性試験を行ったところ，側鎖の炭素数の違いにより活性に差が出ることを明らかにした．そこで，antimycin の生合成経路の解明および類縁体創製を目的とした生合成研究を行うことにした．

Antimycin の構造中にはペプチド結合やエステル結合，低級脂肪酸があることから，non-ribosomal peptide synthase (NRPS)と polyketide synthase (PKS)によって生合成されていることが推測された．以前に，Neft らは，¹⁴C ラベル化された種々のアミノ酸の取り込み実験により，FSA 部分がトリプトファンにより作られていることを証明している．¹⁷⁾

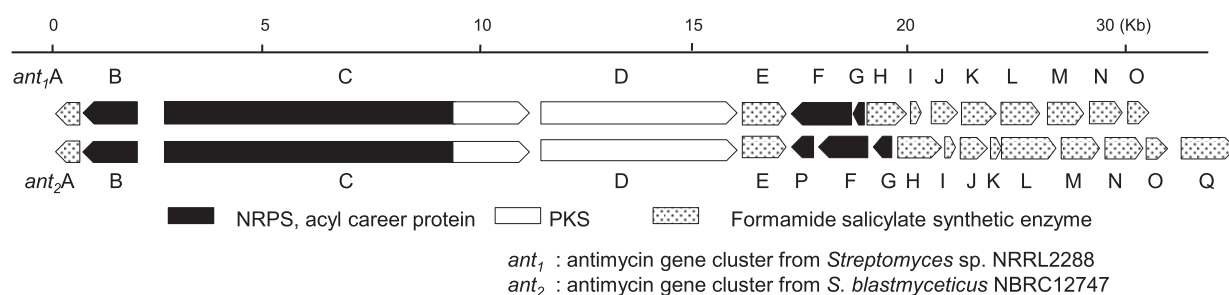


Fig. 2. Genetic organization of the antimycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. NRRL 2288 and *S. blastomyceticus* NBRC 12747

著者らは、antimycin 生合成遺伝子クラスターを得る目的で、antimycin 生産菌 *S. blastomyceticus* NBRC12747 および *Streptomyces* sp. NRRL2288 の染色体から遺伝子ライブラリーを調製した。また、ゲノムシーケンサーの解析により染色体のドラフト配列を取得しアノテーションを行った。その結果、トリプトファンを分解する酵素 tryptophan 2,3-dioxygenase (TDG)と NRPS が確認できた。そこで、これら酵素遺伝子の塩基配列を基にプライマーを作製し、遺伝子ライブラリーを PCR スクリーニングしたところ、陽性のクローンを得ることができた。さらに、このクローンの遺伝子配列を決定し、この配列を基に open reading frame (ORF)解析および機能タンパク質のアノテーション解析を行った。その結果、Fig.2 および Table.1 に示すように、FSA 部分を生合成する酵素群、NRPS および PKS などのジラクトン部分を生成する酵素群の存在が分かった。2 種の菌株から得られた生合成遺伝子クラスターの各 ORF を比較したところ、NBRC12747 株には phosphopantetheinyl transferase (AntP)および kynureninase (AntQ)の 2 つの酵素が多く存在するが、それ以外の 15 個の ORF は一致し、それぞれ非常に相溶性が高かった。また、NRPS をコードする遺伝子 antC の破壊株を調製したところ、antimycin は産生されていなかった。このことから、遺伝子クラスターは antimycin の生合成に関わっていることが証明できた。¹⁸⁾

Table.1. Proposed function of genes in the *ant* cluster

NRRL2288		NBRC12747		Proposed function
Gene	aa	Gene	aa	
ant ₁ A	429	ant ₂ A	628	RNA polymerase
ant ₁ B	429	ant ₂ B	426	acyltransferase
ant ₁ C	2909	ant ₂ C	2967	hybrid NRPS/PKS
ant ₁ D	1254	ant ₂ D	1261	polyketide synthase
ant ₁ E	408	ant ₂ E	462	crotonyl-CoA reductase/carboxylase
		ant ₂ P	244	phosphopantetheinyl transferase
ant ₁ F	492	ant ₂ F	471	CoA ligase
ant ₁ G	85	ant ₂ G	120	acyl carrier protein
ant ₁ H	414	ant ₂ H	362	phenylacetate-CoA oxygenase
ant ₁ I	100	ant ₂ I	199	phenylacetate-CoA oxygenase
ant ₁ J	258	ant ₂ J	258	phenylacetate-CoA oxygenase
ant ₁ K	154	ant ₂ K	150	phenylacetate-CoA oxygenase
ant ₁ L	367	ant ₂ L	337	phenylacetate-CoA oxidoreductase
ant ₁ M	258	ant ₂ M	260	acyl-carrier protein
ant ₁ N	282	ant ₂ N	340	tryptophan 2,3-dioxygenase
ant ₁ O	266	ant ₂ O	253	esterase
		ant ₂ Q	420	kynureninase

3-2. AntC のアデニル化ドメインの特徴的なアミノ酸配列

NRPS は、通常のリボゾームで作られるタンパク質とは異なる機構でペプチド鎖が伸長される。また、NRPS は mRNA のコドンで規定されていない D-アミノ酸や異常アミノ酸も基質とする。Challis ら

は, gramicidin 生合成酵素 GrsA のフェニルアラニン結合性アデニル化 (A)ドメインと過去にクローニングされているペプチド抗生物質の NRPS の A ドメインとのアミノ酸配列を比較したところ, Table. 2 に示すように GrsA のアミノ酸配列 D235, A236, W239, T278, I299, A301, A322 が対応する基質アミノ酸により高度に保存されていることを明らかにしている.¹⁹⁾ したがって, NRPS における基質アミノ酸の規定は A ドメインが mRNA のコドンのような役割をしていることを意味しており, A ドメインのアミノ酸配列により基質アミノ酸を予想することができる.

そこで, AntC モジュール 1 の A ドメインのアミノ酸配列を, 同様に比較したところ, Table 2 に示すように, スレオニン結合性の A ドメインの配列と非常に相関性が高かった. このことから, AntC の A ドメインはスレオニンを基質にしているということが示唆された.

Table. 2. Specificity prediction of adenylation domains in AntC-module1

protein	module	activated amino acid	residue position according to GrsA Phe numbering							peptide antibiotic
			235	236	239	278	299	301	322	
AntC	1	Thr	D	F	W	R	I	V	G	anitimycin
AcmB	1	Thr	D	F	W	R	N	V	G	actinomycin
DptA	4	Thr	D	F	W	S	N	V	G	daptomycin
SnbC1	1	Thr	D	F	W	R	N	V	G	pristinamycin
TlmVII	1	Thr	D	F	W	R	N	V	G	tallysomycin
BlmVII	1	Thr	D	F	W	S	N	V	G	bleomycin
AcmB	2	Val	D	A	Y	F	W	A	V	actinomycin
EntF	1	Ser	D	V	W	H	F	S	L	enterobactin
AngR	1	Cys	D	L	Y	N	M	S	M	siderophore

3-3. *N*-formamidesalicylic acid (FSA) 部分の生合成

FSA 部分の生合成経路は次に示すように行われていると予想された. Tryptophan の 2,3 位が TDG (AntN) により酸化的に開裂して, *N*-formyl kynurenine が生成される. この化合物は kynureninase により反クライゼン縮合様の反応を起こし, さらに脱ホルミル化されてアントラニル酸が生成される. アントラニル酸は CoA ligase (AntF)によりカルボキシル基が CoA 化され, peptide carrier protein (PCP, AntG)と縮合して AntG-アントラニル酸の複合体が形成すると考えられる. AntHLMNO は, 芳香環を分解する酵素群 PaaABCDE と非常に高い相関性を示しており, 芳香環の反応に関与していることが考えられた.²⁰⁾ したがって, この複合体は, AntHLMNO によりエポキシ化された後, 転移反応に続いてホルミル化を起こして FSA へ導かれると推測された. (Fig. 3) このことを確認する目的で, NRRL2288 株に 6-fluorotryptophan を添加して培養したところ,

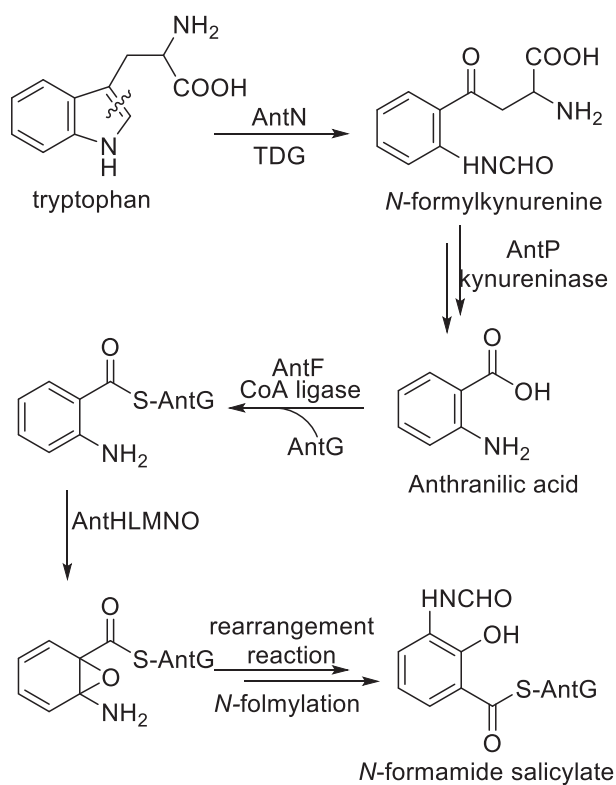


Fig. 3 Hypothesis for the FSA moiety formation

FSA 部分の 5 位にフッ素が導入された antimycin 類縁体が産生された。このことから、AntHLMNO は転移反応を起こして FSA を生成することが支持され、非常に興味深い生合成経路であることが推定できた。

3-4. Antimycin の予想生合成経路

Antimycin のジラクトン部分は、NRPS (AntC) および PKS (AntD) により生合成されと考えられる。AntC は、Fig. 4 に示すように、モジュール 1 に縮合 (C) ドメイン、A ドメイン、PCP が、モジュール 2 に C ドメイン、A ドメイン、ketoreductase (KR) ドメイン、PCP が順番にコードされている。また、AntD は、ketosynthase (KS) ドメイン、acyltransferase (AT) ドメイン、ACP、tailoring enzyme (TE) がコードされている。これらのことから、Fig. 4 に示す生合成経路を予想した。まず、AntG-アントラニル酸複合体とスレオニンが AntC モジュール 1 の C ドメインにより縮合されてペプチド結合が形成され中間体 i へと導かれる。Pyruvate CoA は 2 位のカルボニル基が KR により還元されて水酸基へと変換された後、モジュール 2 の C ドメインによりエステル結合が形成され中間体 ii が生成される。一方、AntD の AT に供給される炭素鎖の短い malonyl CoA は、crotonyl-CoA reductase/carboxylase (CCR) と同定した AntE によるものと考えられる。CCR は、脂肪酸 CoA から生成される *E*-2,3-ene, すなわち crotonyl-CoA を基質として、2 位にカルボキシル基を導入する酵素であることが知られている。したがって、AntE により crotonyl-CoA から alkylmalonyl-CoA が作られると予想される。alkylmalonyl CoA は、AntD-KS により炭素鎖が伸長され中間体 iii へと導かれる。²¹⁾ さらに、TE によりジラクトン環が構築されて deacyl-antimycin が生成され、最終的に、acyltransferase (AntB) によりイソ吉草酸や吉草酸が縮合して antimycin が作られると考えている。現在、FSA を生合成する領域を破壊した株を調製し、FSA によく似た基質を加えて培養することにより新たな類縁体の創製を試みているところである。

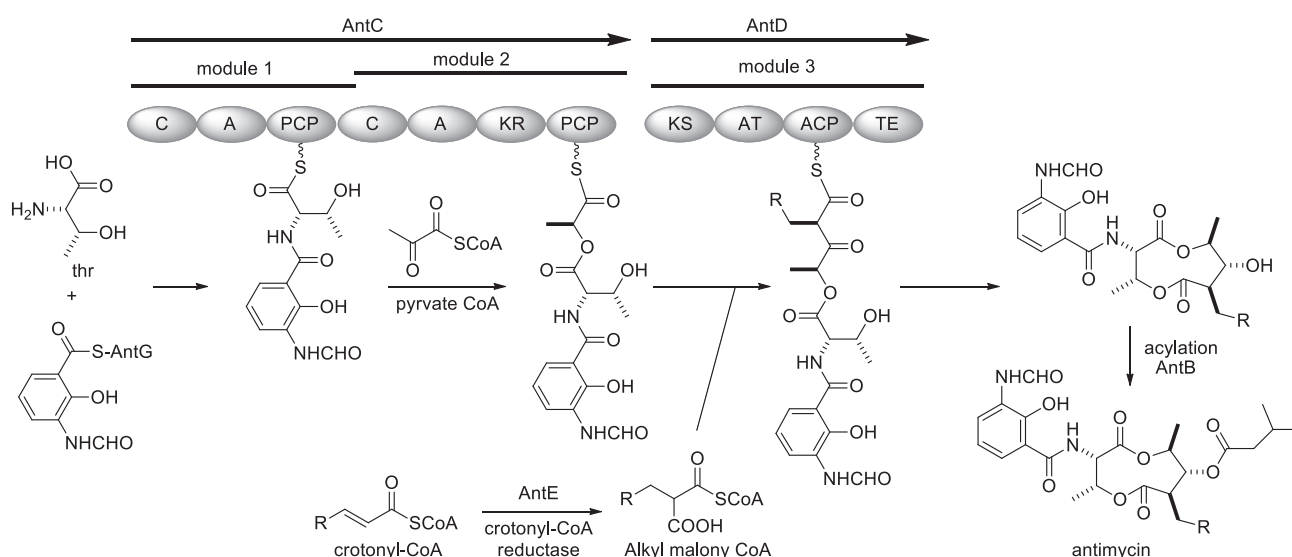


Fig.4. Proposed biosynthetic pathway to antimycin

4. Asukamycin の生合成研究

4-1. Asukamycin 生合成遺伝子クラスターのクローニング

マニュマイシン系抗生物質は、抗菌活性および抗真菌活性、殺虫作用など多様な生物活性を有することが報告されている。²²⁾ 最近、マニュマイシン系抗生物質が RAS ファルネシルトランスフェラーゼ、およびインターロイキン 1 β 変換酵素を阻害することが報告されている。^{23,24)} これらのことから、抗ガン剤あるいは抗炎症剤の開発において、新たなマニュマイシン類縁体の創製が期待されている。

一方、asukamycin は、*S. nodosus* subsp. *asukaensis* ATCC 29757 から産生され、マニュマイシン系に属する抗腫瘍抗生物質である。その構造は、マニュマイシン系抗生物質の特徴である 2-amino-4-hydroxy-5,6-epoxycyclohex-2-enone 部分 (C7N unit) と、“lower chain” および “upper chain” と呼ばれる *trans*-トリエン構造からなっている。“Upper chain” の末端にはシクロヘキサン環が、“lower chain” の末端には 2-amino-3-hydroxycyclopent-2-enone (C5N unit) が存在する。今回、著者らは生物活性および化学構造が興味深い asukamycin に注目し、類縁体の創製および asukamycin の生合成経路解明を目的として、分子生物学的手法を用いた asukamycin の生合成研究を行うことにした。

まず、asukamycin の生合成遺伝子クラスターを取得する目的で、本菌株から Fosmid 遺伝子ライブラリーの構築を行った。また、本菌株のゲノム DNA をゲノムシーケンサーにより解析を行いドラフト配列が得られた。この配列を基に ORF 解析および機能タンパク質のアノテーション解析を行ったところ、シクロヘキサン環部分を生合成する cyclohexane carbonyl (CHC) CoA ligase、および C7N unit を生合成する 3,4-AHBA 合成酵素と非常に相同性が高い遺伝子が認められた。そこで、これら酵素遺伝子の配列を基にプライマーを作製して遺伝子ライブラリーの PCR スクリーニングを行った。その結果、陽性の Fosmid クローンを得ることができ、asukamycin 生合成遺伝子クラスターの存在が類推できた。(Fig. 5)

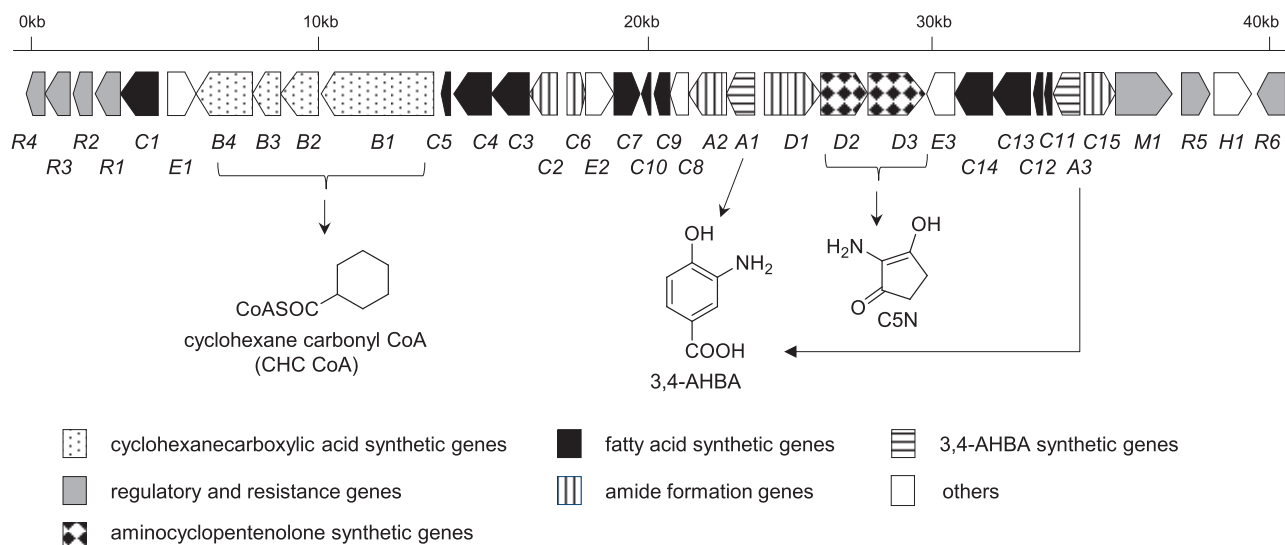


Fig. 5. Genetic organization of the asukamycin biosynthetic gene cluster from *S. nodosus* subsp. *asukaensis* ATCC 29757

4-2. Asukamycin の予想生合成経路

C7N 部分の生合成は、Floss らの取り込み実験により、3,4-AHBA から生成されることが報告されている。²⁶⁾ また、dihydroxyacetone phosphate (DHAP) および aspartate 4-semialdehyde (ASA) を基質として、わずか 2 ステップで 3,4-AHBA を生成する酵素 GriH および GriI が発見されている。²⁷⁾ クラスター中にある AsuA1 および AsuA3 は、それぞれ GriH および GriI と非常に相同性が高いことから、asukamycin の 3,4-AHBA もこれら酵素により生合成されていることが予想された。一方、AsuB1-B4 は、シクロヘキサノカルボン酸を合成する酵素群と高い相同性を示した。²⁸⁾ したがって、CHC CoA は、シキミ酸からこの酵素群より生合成されることが支持される。また、C5N unit は、glycine および succinyl CoA を原料として 5-aminolevulinic acid (ALA) synthase により、ALA を経て生合成されと考えられる。²⁹⁾

AsuC3-5 は脂肪酸合成酵素、AsuC7 および C8, C9 はそれぞれ KR, acyl dehydrogenase, β -hydroxyacyl-[ACP]であることから、トリエン構造の生成に関わることが推定できた。CHC CoA および 3,4-AHBA を出発原料として、これら酵素による炭素鎖伸長により upper および lower chain のトリエン体が構築される。その後、得られた 2 つのトリエンが amide synthetase (AsuD1) によりペプチド結合を形成し、lower chain の末端に C5N unit が縮合して protoasukamycin が作られる。さらに、monooxygenase (AsuE3 または E2) により FSA 部分がエポキシ体へと導かれ asukamycin が得られると予想できる (Fig. 6)。^{30,31)}

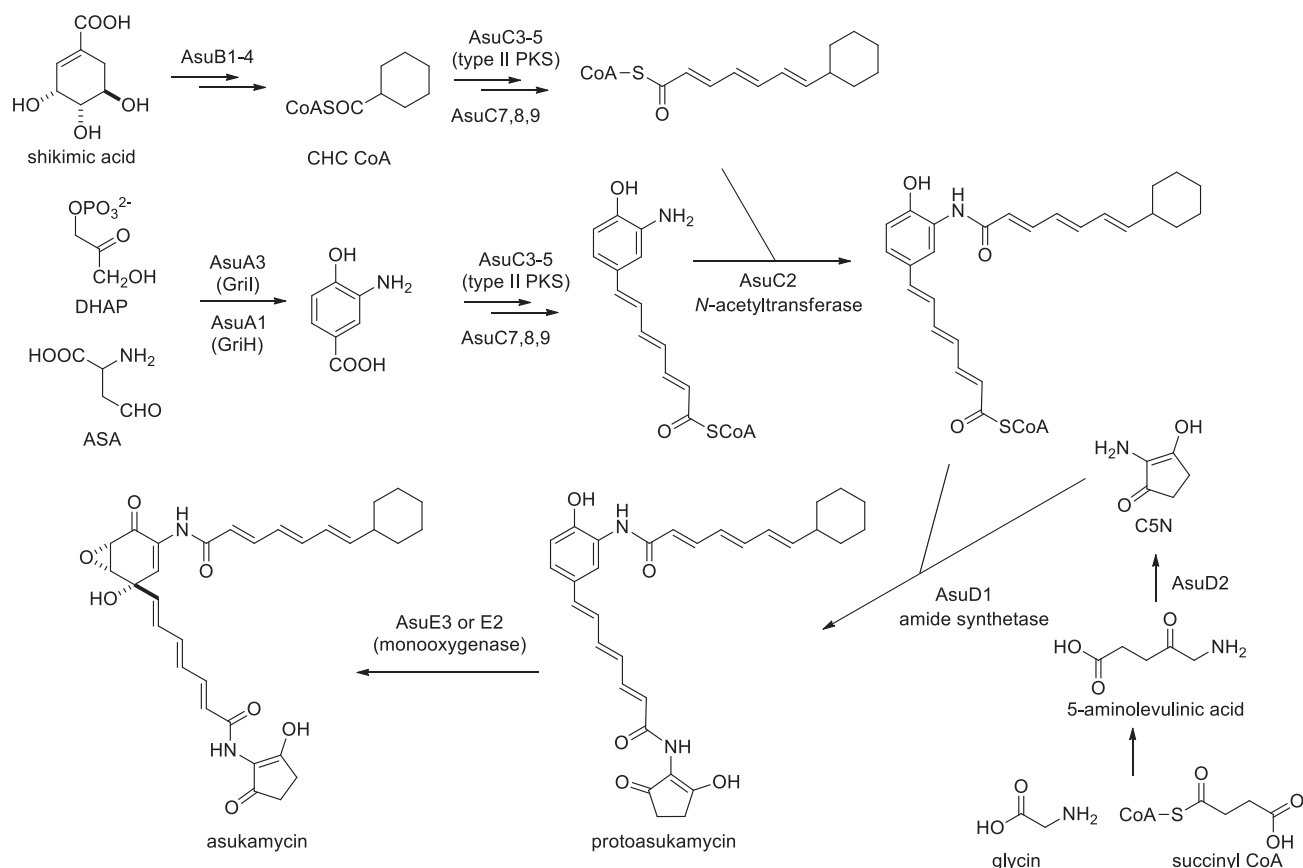


Fig. 6. Proposed pathways to asukamycin

4-3. 遺伝子破壊株の調製と mutasynthesis による新規類縁体の創製

取得した遺伝子クラスターが asukamycin の生合成に関わっているかを確認する目的で、シクロヘキサン環、および C5N 部分の生合成に関与すると考えられる酵素遺伝子 (*asuB3*, および *asuD2*, 両遺伝子) を破壊した株 (Δ *asuB3* 株, Δ *asuD2* 株, Δ *asuB3/D2* 株) を調製した. その結果, Δ *asuB3* 株からはシクロヘキサン部分が欠如した類縁体が, Δ *asuD2* 株からは C5N 部分が欠如した類縁体が得られた. また, Δ *asuB3/D2* 株からは両方が欠如した類縁体が得られ, このクラスターは asukamycin を生合成していることが明らかにされた. そこで, これら遺伝子破壊株を利用して mutasynthesis による新たな類縁体の創製を試みた. Mutasynthesis とは, 遺伝子破壊株に生合成中間体もしくはそれによく似た構造の基質を添加して培養することにより, 新規類縁化合物を産生させる方法である.³²⁾ 今回, シクロヘキサン部分を別のシクロアルカン環へと変換するため, 出発原料であるシクロヘキサンカルボン酸の代わりに数種のシクロアルカンカルボン酸を加えて, シクロヘキサン合成酵素の破壊株 Δ *asuB3* および Δ *asuB3/D2* で培養したところ, それぞれに相応するシクロアルカンへと置き換わった新規アスカマイシン類縁体の産生が確認できた. (Fig. 7)

4-4. 類縁体の生産性の向上を目指した改変株の調製

シクロアルカンカルボン酸を添加した破壊株 Δ *asuB3* および Δ *asuB3/D2* の培養は, 新規類縁体の産生は確認できたが, 様々な生物活性試験に供するための十分な量は確保できなかった. したがって, 大量に新規類縁体が産生されるシステムを構築する必要がある. クラスター中には, 転写因子などの調節遺伝子と相同性の高い *asuR1-5* が存在していた. それぞれの遺伝子を破壊した株を調製して培養したところ, Δ *asuR1* および *R5* 株からは, 全く asukamycin が産生していなかった. このことから, *asuR1* および *R5* は, 生合成遺伝子の転写を促進することが考えられた. そこで, *AsuR1* および *R5* を大量発現できるベクターを作製し, 親株にベクターを導入した改変株を調製した. しかしながら, asukamycin の産生量は, 親株に比べて, *asuR1* 導入株は 5 倍程度高かったが, *asuR5* 導入株は同程度しかなかった. クラスターでは, Fig. 5. に示すように *asuR1-R4* が連続して存在しているため, この 4 つの調節遺伝子をカセットとして導入した株を作製した. その結果, asukamycin の生産量は親株に比べて 20 倍と飛躍的に向上した. このことは, *asuR1-R4* の 4 つの遺伝子が生合成クラスター全体の転写の促進に関わっていることがわかった.^{31, 32)}

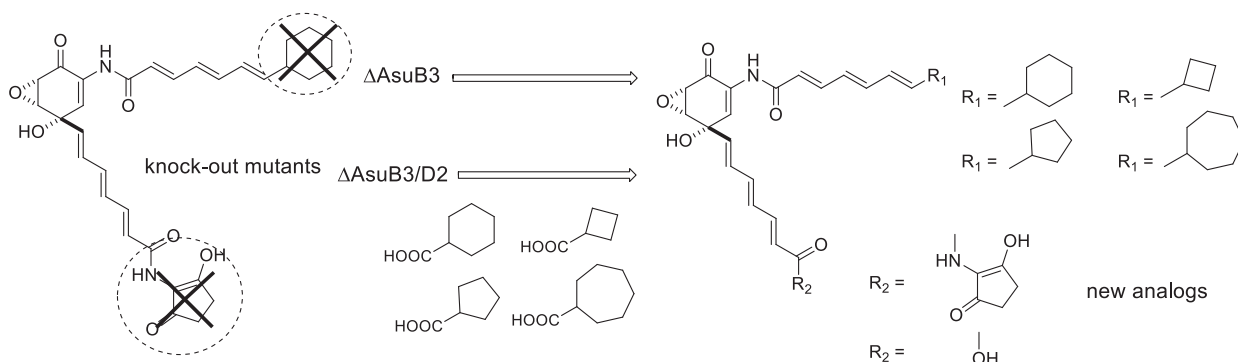


Fig. 7. Mutasynthesis of asukamycin analogs using knock-out mutants with several cycloalkane carbonic acid

したがって、 $\Delta asuB3$ および $\Delta asuB3/D2$ に調節遺伝子 *asuR1-R4* を導入した株にも、種々のシクロアルカンカルボン酸を添加した場合、数倍以上の生産量の向上が期待できた。今後、この遺伝子改変株を調製し、大量に培養して新規類縁体の単離・精製し、詳細な生物活性を行う予定である。

5. まとめ

Antimycin および asukamycin の生合成遺伝子クラスターのクローニングに成功した。Antimycin においては、FSA が転移反応を伴って生合成されることを解明し、また、ジラクトンの生成経路を特定することができた。Asukamycin においても、生合成経路を推測することができ、数種の遺伝子破壊株を調製することができた。また、破壊株を利用してシクロヘキサン部を種々のシクロアルカンへと変化させた新規類縁体を創製した。

近年、ゲノムシーケンサーなどの遺伝子解析技術が進歩し、以前に比べて迅速に遺伝子を特定することが可能となった。著者らも、これら手法を用いて放線菌代謝産物の生合成遺伝子群を、より早く発見することができた。さらに、遺伝子を改変した活性物質生産菌を利用することにより、新しい類縁体を創製することが可能となる。まだ医薬品として利用できていない放線菌代謝産物は、数多くあると考えられることから、今後、この手法を用いれば、医薬品あるいは候補化合物を見出すことができると期待される。

謝辞

本研究は、徳島文理大学薬学部の浅川義範教授、角田鉄人教授、西井健助教、稲井誠助教、オレゴン州立大学薬学部の Taifo Mahmud 准教授、東京大学大学院薬学研究科の阿部郁朗教授、淡川孝義助教、中国科学院上海有機化学研究所の Wen Liu 教授のご助言、ご協力により行われたものです。なお、本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金によって実施されたものであり、併せて御礼申し上げます。

References

- 1) Cragg G. M., Newman D. J., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1830**, 3670-95 (2013).
- 2) Cragg G. M., Newman D. J., *J. Nat. Prod.*, **75**, 311-35 (2012).
- 3) Kim J. H., Perfect J. R., *Rev. Infect. Dis.*, **11**, 677-90 (1989)
- 4) Goto T., Kino T., Hatanaka H., Okuhara M., Kohsaka M., Aoki H., Imanaka H., *Transplant. Proc.*, **23**, 2713-7 (1991)
- 5) Clissold S. P., Edwards C., *Drugs.*, **35**, 214-43. (1988)
- 6) Matsuoka T., Miyakoshi S., Tanzawa K., Nakahara K., Hosobuchi M., Serizawa N., *Eur. J. Biochem.*, **184**, 707-13 (1989)
- 7) Fukase H., Horii S., *J. Org. Chem.*, **57**, 3651-8. (1992)
- 8) Bai L., Li L., Xu H., Minagawa K., Yu Y., Zhang Y., Zhou X., Floss H. G., Mahmud T., Deng Z., *Chem. Biol.*, **13**, 387-97 (2006)
- 9) Minagawa K., Zhang Y., Ito T., Bai L., Deng Z., Mahmud T., *ChemBioChem.*, **8**, 632-41 (2007)
- 10) Stratmann A., Mahmud T., Lee S., Distler J., Floss H. G., Piepersberg W., *J. Biol. Chem.*, **274**, 10889-96 (1999)

- 11) Ito T., Roongsawang N., Shirasaka N., Lu W., Flatt P. M., Kasanah N., Miranda C., Mahmud T., *ChemBioChem.*, **10**, 2253-65 (2009)
- 12) Dong H., Mahmud T., Tornus I., Lee S., Floss H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 2733-42 (2001)
- 13) Kang Q., Shen Y., Bai L., *Nat. Prod. Rep.*, **29**, 243-63 (2012)
- 14) Dunshee, B. R., Leben, C., Keitt, G. W., Strong, F. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2436 (1949)
- 15) Wikstrom M. K., Lambowitz A. M., *FEBS letters*, **40**, 149-53 (1974)
- 16) Inai M., Nishii T., Tanaka A., Kaku H., Horikawa M., Tsunoda, T., *Eur. J. Org. Chem.*, 2719-29 (2011) ANT17
- 17) Neft N., Farley T. M., *J. Antibiot.* **25**, 298-303 (1972)
- 18) Yan Y., Zhang L., Ito T., Qu X., Asakawa Y., Awakawa T., Abe I., Liu W., *Org. Lett.*, **14**, 4142-5 (2012)
- 19) Challis G.L., Ravel J., Townsend C. A., *Chem. Biol.*, **7**, 211-24 (2000)
- 20) Teufel R., Mascaraque V., Ismail W., Voss M., Perera J., Eisenreich W., Hachnel W., Fuchs G., *Proc. Natl. Acad. U.S.A.*, **107**, 14390–14395. (2010)
- 21) Quade N., Huo L., Rachid S., Heinz D. W., Mueller R., *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 117–124 (2012)
- 22) Sattler I., Thiericke R., Zeeck A., *Nat. Prod. Rep.*, **15**, 221-40 (1998)
- 23) Hara M., Akasaka K., Akinaga S., Okabe M., Nakano H., Gomez R., Wood D., Uh M., Tamanoi F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 2281-2285 (1993)
- 24) Tanaka T., Tsukuda E., Uosaki Y., Matsuda Y. *J. Antibiot.*, **49**, 1085-1090 (1996)
- 25) Omura S., Kitao C., Tanaka H., Oiwa R., Takahashi Y., *J. Antibiot.*, **29**, 876-81 (1976)
- 26) Hu Y., Floss H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 3837-44 (2004)
- 27) Suzuki H., Ohnishi Y., Furusho Y., Sakuda S., Horinouchi S., *J. Biol. Chem.* **281**, 36944-51 (2006)
- 28) Chen S., von Bamberg D., Hale V., Breuer M., Hardt B., Müller R., Floss H. G., Reynolds K. A., Leistner E., *Eur. J. Biochem.*, **261**, 98-107 (1999)
- 29) Petříček M., Petříčková K., Havlíček L., Felsberg J., *J. Bacteriol.*, **188**, 5113-23 (2006)
- 30) Pospíšil S., Petříčková K., Sedmera P., Halada P., Olšovská J., Petříček M., *J. Appl. Microbiol.*, **111**, 1116-28 (2011)
- 31) Xie P., Sheng Y., Ito T., Mahmud, T., *Appl. Microbiol. Biotech.*, **96**, 451-60 (2012)
- 32) Bode H. B., Meiser P., Klefisch T., Cortina N. S., Krug D., Göhring A., Schwär G., Mahmud T., Elnakady Y. A., Müller R., *ChemBioChem.*, **8**, 2139-44 (2007)
- 33) Ito, T., *Yakugaku Zasshi*, **133**, 1007-15, (2013)